

Effect of hypoxia on nitric oxide production and its synthase gene expression in rat smooth muscle cells

著者	洪 英
内容記述	Joint authors: Seiji Suzuki ... [et al.] Offprint. Originally published in: Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 268, pp. 329-332, 2000 Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (A), no. 2654, 2001.3.23
発行年	2001
その他のタイトル	低酸素のラット血管平滑筋細胞からの一酸化窒素の産生及びその合成酵素の遺伝子の発現に及ぼす影響
URL	http://hdl.handle.net/2241/1086

氏 名 (国 籍)	洪 英 (中 国)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2654 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	医学研究科
学 位 論 文 題 目	Effect of hypoxia on nitric oxide production and its synthase gene expression in rat smooth muscle cells (低酸素のラット血管平滑筋細胞からの一過性窒素の産生及びその合成酵素の遺伝子の発現に及ぼす影響)
主 査	筑波大学教授 医学博士 山 口 巖
副 査	筑波大学教授 医学博士 小 山 哲 夫
副 査	筑波大学教授 薬学博士 幸 田 幸 直
副 査	筑波大学教授 医学博士 三 輪 正 直
副 査	筑波大学助教授 医学博士 川 上 康

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

一酸化窒素 (NO) は様々な組織にて産生され、多種多様な生理作用を有することが報告されている。

NOSには3つのアイソフォームが存在しnNOSと、eNOSが構成型NOS (cNOS) といわれるカルシウム・カルモジュリン依存型のNOSであり、もう一つのアイソフォームはiNOSと呼ばれ、L-アルギニンと酸素によってNOを形成し、マクロファージや平滑筋細胞でサイトカインやLipopolysaccharide (LPS) によって活性が亢進する。酸素はこれらの反応に必要なが、低酸素レベルにおけるiNOS発現の変化は不明である。本研究では培養血管平滑筋細胞を用いて、サイトカインであるインターフェロン γ (IFN- γ) と炎症惹起物質LPSの刺激によるNO産生およびiNOSmRNAに対する低酸素の影響を検討した。

(対象と方法)

ラット大動脈血管平滑筋細胞 (Rat SMCs) を5～6週齢のWistar系雄性ラットの動脈より単離した。培養液にはDMEMに10%ウシ胎児血清、抗菌剤を添加した培地を用いた。Normoxia培養は37℃、湿度100%、20%O₂、5%CO₂の条件下で行い、Hypoxia培養は37℃、0.2%O₂、6.2%CO₂のGasPak Anaerobic Systemで行った。細胞の生存能力をTrypan blue dyeで評価した。

NOの測定方法：Rat SMCsを35mm dishにまき、通常の培地にてコンフルエントになるまで培養し、用いた培養液中のLPS濃度を10 μ g/mlに調整し、IFN- γ を100u/mlに調整した。Normoxiaで24h培養またはHypoxiaで3h, 6h, 12h, 24h培養した。回収した培養上清を試料としてGriess試薬を加え、Bradford法で測定した蛋白あたりのNOxの濃度を算出した。

iNOSmRNAの発現にはNorthern blot analysis法を用いた。

(結果)

- 1) IFN- γ あるいはLPSを加えた平滑筋細胞において通常酸素状態および低酸素状態下のいずれにおいてもNO_x濃度に変化は認められなかったが、IFN- γ とLPSの両方を加えると通常酸素状態で著明に増大した。対照的に低酸素状態下ではIFN- γ とLPSの両方を加えてもNO_x濃度に変化はなく、NO_x産生は抑制された。細胞生存は低酸素状態で24時間変化することはなかった。
- 2) IFN- γ を加えた平滑筋細胞において通常酸素状態および低酸素状態下のいずれにおいてもiNOSmRNA発現量に変化は認められなかった。LPSのみを加えた平滑筋細胞においては通常酸素状態下および低酸素状態下ともわずかな発現にとどまったが、IFN- γ とLPSの両方を加えると通常酸素状態下および低酸素状態下のいずれにおいても著明に発現した。 β -actinでiNOSmRNAを補正した結果、IFN- γ あるいはLPS、またはその両方を加えた平滑筋細胞では通常酸素状態および低酸素状態下のいずれにおいてもiNOS発現量に有意差はなかった。故に低酸素では、IFN- γ あるいはLPS、またはその両方を加えてもiNOSmRNA発現に影響がないことが示唆された。
- 3) IFN- γ とLPSの両方を加えた平滑筋細胞のNO_x産生は、低酸素状態で時間依存的に低下した。

(考察)

IFN- γ とLPSによりNO産生や活性を効率よく亢進させるためには、いくつかの条件が必要となる。

第1ポイントは、NO合成酵素のmRNAの発現の変化である。mRNAの増加によりLPSのみでわずかに発現したが、IFN- γ のみではほとんど検出できなかった。しかし、IFN- γ にLPSを加えると著明にiNOSmRNA発現が増大した。この結果により、IFN- γ とLPSがiNOSmRNA発現を調節していることが示唆された。一方、IFN- γ 、あるいはLPS、またはその両方を加えたどの状態下でもiNOSmRNA発現において低酸素の影響はなかったことから、低酸素はiNOSmRNA発現に影響を及ぼさないことが示唆された。低酸素によって生じるiNOS由来のNO産生メカニズムは不明であるが、種あるいはcell line依存の差であると考えられる。

第2ポイントは、L-arginine-NO経路である。IFN- γ やLPSのみを加えた平滑筋細胞において通常酸素状態下でNO産生に差はなかったが、IFN- γ とLPSの両方を加えた通常酸素状態下でNO産生は著明に増大した。このことはIFN- γ とLPSとの相互作用によると考えられる。低酸素状態下のIFN- γ とLPSの両方を加えるとどの状態下においてもNO産生は70%減少したが、iNOSmRNAには変化なく、酸素がNO産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究の結果からIFN- γ とLPSに曝されたときに増加するNO産生が、炎症組織の血管拡張と血液の灌流増大を引き起こすと考えられる。また、低酸素下のNO産生は炎症組織で減少し、炎症からの回復を遅らせることが考えられた。

(結論)

血管平滑筋細胞がLPS、IFN- γ などによりNO産生を増加させることの意義は血管を拡張し、炎症組織の血流を増加させ、殺菌作用により炎症を早期に改善させることにありと考えられる。本研究の結果は酸素の存在が炎症反応の改善に重要であることを示唆した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

一酸化窒素(NO)は様々な組織にて産生され、多種多様な生理作用を有することが報告されているが、本研究では低酸素や炎症における誘導型NO合成酵素の影響の解明が試みられた。その結果、インターフェロン γ (IFN- γ)とLipopolysaccharide(LPS)を加えたラット大動脈血管平滑筋細胞において、IFN- γ とLPSの両方を加えると通常酸素状態で著明に増大したNO_x濃度は、低酸素状態下では変化なく、NO_x産生は抑制されたが、iNOSmRNA

発現に影響を与えないこと、IFN- γ と LPS の両方を加えた平滑筋細胞の NO_x 産生は低酸素状態下で時間依存的に低下するとの所見が得られ、酸素の存在が炎症反応の改善に重要であると結論した。低酸素状態が全身に発生する肺炎などや、局所に発生する糖尿病壊疽などでは、血管平滑筋における NO 産生が抑制されるため炎症反応の改善が遅延する可能性が考えられ、臨床的にも重要な意義を有する研究結果が得られた。IFN- γ と LPS は iNOS mRNA と NO 産生を増大させるが酸素が iNOS から NO 産生の過程の中でいかなる部分に作用するかは明らかにされる必要がある。

本研究は炎症の過程における低酸素状態の意義を解明した貴重な実験研究である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認められる。